

多环芳烃的测定----液相色谱法

1 范围

本法规定了用液相色谱分析法测定水中的萘(NPH)、荧蒹(FLU)、苯并(b)荧蒹(BbF)、苯并(k)荧蒹(BkF)、苯并(a)芘(BaP)、苯并(ghi)䓛(BPer)和茚并(1, 2, 3, -cd)芘(IP)。

本法适用于供水和原水中多环芳烃(PAH_S)的测定。

取水样 500ml, 将固相萃取洗脱浓缩到 0.5ml, 进样 10 μL, 最低检测质量浓度(单位 ng/L)为: NPH: 35.5, FLU: 1.2, BbF: 1.7, BkF: 0.05, BaP: 1.0, Bper: 1.3, IP: 5.5。

2 原理

硅胶基底的共价特性可使许多化学官能团(C₈或C₁₈)对其表面进行化学修饰, 使水中半挥发、不挥发性有机污染物得以保留。

本法采用以粗颗粒(40 μm左右)硅胶为基底的C₁₈键合相作为固相吸附载体, 对水中的PAH_S进行吸附保留; 用二氯甲烷等低极性有机溶剂洗脱PAH_S后, 用带紫外检测器的高效液相色谱仪进行定性和定量。

3 试剂

3.1 流动相: 甲醇和水

3.1.1 甲醇: 色谱纯, 用前通过滤膜过滤和脱气。

3.1.2 水: 用 0.2 μm 滤膜过滤。

3.2 配制标准样品和水样预处理的试剂

3.2.1 二氯甲烷: 色谱纯。

3.2.2 四氢呋喃: 色谱纯。

3.2.3 异丙醇: 色谱纯。

3.2.4 硫代硫酸钠。

3.3 标准溶液: 标准储备液。

4 仪器

4.1 玻璃器皿

所用玻璃器皿均需经铬酸洗液浸泡, 洗净后自然晾干。

4.1.1 采样瓶: 带磨口玻璃塞的棕色玻璃细口瓶。

4.1.2 尖底浓缩管: 最小分度为 0.1ml, 容积必须进行标定, 带磨口玻璃塞。

4.1.3 25 μ L 微量注射器（液相色谱仪手下工进样器）。

4.1.4 量筒：50mL、100mL、和 1000mL。

4.2 样品前处理装置

4.2.1 固相萃取抽滤装置（负压）或恒流蠕动泵（正压）。

4.2.2 真空泵（30 L/min）。

4.2.3 SPE固相萃取柱：填料为 40 μ m的C₁₈键合相（500mg）吸附剂。

4.3 高压液相色谱系统

4.3.1 HPLC 恒流泵：流速精度为 0.01 mL/min。

4.3.2 色谱柱：反相 98 (ODS) 分析柱，推荐柱长为 150mm，内径为 4.6mm，粒度为 5 μ m 并配备 40mm 相同填料的预分离柱。

4.3.3 荧光检测器：具有激发/发射光谱扫描功能，同时具有波长程序设置功能。

4.3.4 紫外检测器：可单独使用，也可与荧光检测器串联使用。

4.3.5 数据处理系统：色谱工作站或积分仪。

5 样品

5.1 样品瓶的准备

用干净的棕色玻璃瓶作为采样瓶。

5.2 水样采集

样品必须采集在棕色玻璃瓶中，若水中有残余氯，需在每升水中加入 25mg 的硫代硫酸钠除氯；若不能立即进行样品处理，建议在采样时每升水样加入 200mL 的异丙醇作为样品稳定剂（同时也作为基体改性剂）。

5.3 水样保存

水样应置于暗处，4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存，应在 24h 内尽快进行样品预处理。将吸附后的固相萃取柱直接贮存在冰箱中，在 20 天内将 PAHs 从固体萃取柱上洗脱下来，进行样品分析。

5.4 样品预处理

5.4.1 水样准备：量取 500~2000mL 水样（根据配备的液相色谱仪灵敏度和水源污染状况，可选择合适的水样体积）。每 1L 水样，加入 200ml 的异丙醇（也可在采样时加入），混合均匀。

5.4.2 SPE 柱活化及条件化：先用 2ml 二氯甲烷注入柱子，让其缓缓流过，并抽空气 5min，以去除填料中可能存在的干扰物，再加入 2ml 的甲醇活化柱子，最后用去离子水（加入和水样相同含量的改性剂）移去活化溶剂（条件化），但注意在对 SPE 柱进行活化和条件化时，

不可将柱床抽干，以防止填料层产生裂隙，使回收率降低。

5.4.3 水样富集：以 4~5ml/min 左右的流速，使水样全部通过 SPE 柱后，加入 5ml 纯水，让其缓缓通过，以去除水溶性干扰物质，通入净化空气 30min，使已吸附的 SPE 柱彻底干燥。

5.4.4 洗脱与浓缩：将 2ml 二氯甲烷或四氢呋喃分两次加入柱管，分别洗下被测组分，合并后的洗脱液用氮气浓缩至 0.1ml 以下，再定容至 0.1~0.5ml，待进样分析。

6 测定步骤

6.1 色谱条件的选择（根据仪器型号、配置状况，选择合适的色谱条件）

6.1.1 流动相：甲醇和水。根据色谱柱的柱效和分离度，选择合适的流动相配比。如果用甲醇/水体系能满足样品的分离要求，就不必再用其他流动相体系，如果用纯甲醇即可达到分离效果，就不要用水作为流动相成分。

6.1.2 洗脱模式及洗脱流速：采用等度洗脱，流动相为甲醇：水=80:20，洗脱速率为 1.0ml/min。如果分离效果不理想，适当增加流动相中水的比例，或考虑梯度洗脱。

6.1.3 柱箱温度控制：使用色谱柱温箱，柱箱温度为 35℃。

6.1.4 检测器波长设置

6.1.4.1 荧光检测器：本方法首先进行激发和发射光谱的扫描，根据所获光谱图，找出各化合物的特征激发和发射波长，见表 1。

表 1 多环芳烃最佳的荧光激发和发射波长

PSHs	激发波长 λ_{ex} , nm	发射波长 λ_{em} , nm
FLU	226	449
BbF	302	452
BkF	302	431
BaP	297	405
Bper	302	420
IP	305	500

为获得较高方法的灵敏度，根据最优化柱系统条件下获得的各 PAHs 的保留时间，进行波长程序设置，以便使其能在最优化的激发和发射波长下进行检测。

6.1.4.2 紫外检测器：检测波长为 254nm（如果当地水源中背景干扰严重，影响了检测，可选用其他紫外波长）。

6.1.5 数据记录和处理系统：各型色谱工作站均可使用，色谱工作站兼有积分仪功能。

同时还具有双通道数据采集、谱图再处理及精确的定性定量分析等功能。

若采用积分仪，要进行合理的参数设置，以便记录下理想的谱图。

6.2 标准曲线的绘制

本方法使用外标法定量。

6.2.1 标准样品的制备

根据液相色谱仪的线性工作范围，选择不同浓度的标准工作溶液（至少 5 个点），所用标准工作液由混合的 PAHS 标准液用甲醇稀释制得。

浓度系列	NPH mg/L	FLU μ g/L	BbF μ g/L	BkF μ g/L	BaP μ g/L	BPer μ g/L	IP μ g/L
1	2.0	20.0	8.0	8.0	20.0	32.0	20.0
2	4.0	40.0	16.0	16.0	40.0	64.0	40.0
3	6.0	60.0	24.0	24.0	60.0	96.0	60.0
4	8.0	80.0	32.0	32.0	80.0	128.0	80.0
5	10.0	100.0	40.0	40.0	100.0	160.0	100.0
相关系数	0.999	0.999	0.999	0.997	0.998	0.996	0.999

6.2.2 标准液的使用

每个工作日必须测定一种或几种浓度的标准溶液以检验标准曲线，若某一化合物的测定值与期望值的相对标准偏差大于 10%，则必须重新绘制标准曲线。

6.2.3 标准曲线的表示

以响应值对浓度作标准曲线，由回归方程计算测定结果。若采用工作站，只需按已设定的样品序列依次进样，计算机自动存储标准曲线，自动计算每一次进样的测定结果。若采用积分仪，可采用常规标准曲线绘制和样品测定结果的计算方式。

6.3 样品测定

6.3.1 进样

6.3.1.1 进样方式：以注射器人工进样或自动进样器进样。

6.3.1.2 进样量：5~25 μ L。

6.3.1.3 操作：用待测试样调湿微量注射器针头及针筒，并洗涤三次，缓缓反复多次尽可能排出针筒内气泡，迅速注射样品至 HPLC 柱头，进行 HPLC 分析，并用甲醇洗涤注射器，以备下次进样。

6.3.2 记录：由色谱工作站完成。

6.4 定性分析

6.4.1 保留值定性法。

6.4.2 鉴定的辅助方法。

6.5 定量分析

用外标法计算。

7 计算

采用色谱工作站，计算出各组分的含量，单位 $\mu\text{g/L}$ 。

样品浓度：

$$\rho_i = \rho_0 V_t / V_s$$

式中： ρ_i ——试样中组分质量浓度， $\mu\text{g/L}$ 。

ρ_0 ——固相萃取洗脱液质量浓度， $\mu\text{g/L}$ 。

V_t ——固相萃取洗脱液浓缩后定容体积， mL 。

V_s ——水样体积， mL 。

如果采用积分仪，样品浓度：

$$\rho_i = A_i B_i V_t / V_s V_i$$

式中： ρ_i ——试样中组分质量浓度， $\mu\text{g/L}$ 。

A_i ——试样中组分的进样量对峰高（或峰面积）比值， $\text{ng/mm}(\text{ng/mm}^2)$ 。

B_i ——样品中组分峰高（或面积）， $\text{mm}(\text{mm}^2)$ 。

V_t ——萃取液浓缩后体积， μL 。

V_i ——注射样品的体积， μL 。

V_s ——水样体积， mL 。

8 注意事项

8.1 使用标准样品条件

8.1.1 标准样品进样体积与试样体积相同，标准样品浓度应接近试样的浓度。

8.1.2 标准样品和试样尽可能同时分析，直接与单个标样比较以测定浓度。

8.2 安全

8.2.1 所用有机溶剂甲醇有毒性，四氢呋喃、正己烷易燃，均为易挥发性试剂，操作时必须遵守有关规定，重蒸馏有机溶剂必须在通风柜中进行，严禁明火。

8.2.2 分析的PAHs为致癌物，因此要有保护措施。

8.2.3 用过的废液集中处理后排放。

附 1:

戴安高效液相色谱



性能指标:

- 1、P680 HPG 低压四元梯度泵：双柱塞串联方式，采用等动力学预压缩技术（Gynkotech 专利），提供无脉冲流动相且无需阻尼器，对高效液相色谱系统的重现性和性能都有显著的提高；自动液漏检测。
 - (1)、具有溶剂自动补偿功能；延迟体积：<400ul；压力范围：0~7250psi(500bar)；
 - (2)、压力脉冲：<1%；流速精度：±0.1%，at±1ml/min；
 - (3)、流量范围：0.001~10ml/min，0.001ml/min 增量；
- 2、UV170 检测器：四波长检测技术，可升级到二极管阵列检测器。
 - (1)、灯源：氙灯；波长范围：200~595nm；
 - (2)、噪声：±5×10⁻⁶AU（干电池噪声 254 nm，1 秒）；
 - (3)、光谱带宽：1.9~400nm，程序可调；波长精度：±0.75 nm；
 - (4)、波长校正：内置氧化钽滤光片（符合 ASTM 标准）。

附 2:

液相色谱操作规程

一、电源检查

各设备是否联接好

二、仪器开机

1、P680 电源接通后, 根据实验要求 (国家标准方法) 设定参数。

1)、流动相流速

按 Flow 键后, 按数字键输入, 按 Enter 键确认。

2)、混合比例

按 A/B/C/D 键后, 在压力显示窗口显示所选通道的混合比例。按数字键输入, 按 Enter 键确认。

注意: A、B、C、D 四个通道混合比例的代数和必须是 1。

3)、压力极限

按 Max/Min 键后, 按数字键输入, 按 Enter 键确认。如果 P680 在运行时高于高压极限或者低于低压极限, 停泵的同时, Off 指示灯亮, A、B、C、D、MIN、MAX 指示灯闪亮; P680 和 CHROMELEON 的屏幕中也将出现相应的错误提示。

2、启柱温箱, 根据要求设定温度。

3、开启检测器, 氘灯不会自动地开。灯的开/关必须通过 CHROMELEON™ 执行, 为了获得最佳的结果, 灯必须在分析前 30 分钟开。

注意: 在关灯的命令发出后, 再次开灯须等待 5 分钟以上的时间。否则灯会因为过热而损坏。

4、开启电脑, 进入变色龙工作站, 通过电脑联机。

5、预热一小时。

三、手动进样

将系统内气泡完全排出。设定工作站进样方法与各项参数, 抽出一毫升左右样品, 闭合进样阀, 将样品注射进阀门, 然后尽量快速打开进样阀, 在采样时间内等待工作站采集样品数据, 做出色谱图。

四、色谱图处理

根据国家标准方法的要求, 可采用内标法、外标法、单点法、多点法, 并进行积分处理, 算出结果。

五、关机

通过 CHROMELEON TM 色谱工作站将 P680A 泵和 UVD170S 检测器断开，然后关闭 P680A 泵和 UVD170S 检测器电源，再关闭 CHROMELEON TM 色谱工作站，电脑。

注意事项：

- 1、若系统上一个样和下一个样互不溶，则需用二者都溶的溶剂清洗。
- 2、非极性溶剂不可长期使用，如二氯甲烷、三氯甲烷等。
- 3、氙灯不可频繁地开关，否则会减少寿命。
- 4、要勤换密封圈清洗液（2次/星期），配制比例为：甲醇（异丙醇）：水=1：9。
- 5、所用的清洗系统用水要加入 10%的甲醇。
- 6、盐类缓冲溶液使用后，应用纯水 10%甲醇清洗系统半小时，再用甲醇洗半小时保护柱子。
- 7、使用前用 10%甲醇+水洗 5 分钟再开始进流动相。
- 8、若压力不稳，则要先考虑系统内是否有气泡，一般波动不应超过 1%。
- 9、排气泡应每个通道单独排，不应混排。若不停产生气泡，则流动相应用超声排气，或滤头用超声波进行清洗。
- 10、柱温箱应注意为能漏液。